TP – ETUDE DES ENZYMES

Le but de ce TP est d'étudier un type de protéine particulier, les enzymes. Nous prendrons l'exemple de l'amylase, enzyme présente dans la salive.

L'eau iodée (=lugol) permet de tester la présence de polymère de glucose, tel que l'amidon $(C_6H_{10}O_5)_n$.
Il suffit de placer quelques gouttes sur la substance à tester.

La liqueur de Fehling (bleue) permet de tester la présence de sucres réducteurs, comme le glucose $C_6H_{12}O_6$.
Il suffit de placer 2 ml de la solution à tester dans un tube à essai, d'y rajouter 2 ml de liqueur de Fehling et de porter à ébullition. Il faut s'arrêter dès les premières bulles.
Attention ! Les tubes doivent TOUJOURS être tournés vers le mur et JAMAIS vers quelqu'un.

A. Mise en évidence des glucides de la mie de pain

Mettez quelques gouttes d'eau iodée (=lugol) sur de la mie de pain.
Décrivez la réaction et **concluez**.
Réalisez la réaction à la liqueur de Fehling à chaud sur de la mie de pain mélangée à de l'eau. **Schématisez** le résultat et **concluez**.

B. Action de la salive sur la mie de pain

Si on laisse une heure de la salive au contact de la mie et si l 'on réalise ensuite les tests à l'eau iodée et à la liqueur de Fehling, on obtient les résultats suivants :

- La coloration de l'eau iodée reste jaune,
- Il y a un très abondant précipité rouge brique avec la liqueur de Fehling.

Par comparaison avec les résultats obtenus en A, **définissez** le rôle de la salive dans la digestion de la mie de pain.

C. Action de la salive (ou de l'amylase) sur l'empois d'amidon

L'empois d'amidon est obtenu en délayant de l'amidon en poudre dans de l'eau puis en portant l'ensemble à ébullition.
On utilisera de l'amylase, extrait de la salive, plutôt que de la salive complète.

TUBES A REALISER

NB : Comme l'on cherche à comparer les tubes, il est important que les quantités soient identiques d'un tube à l'autre, on remplacera donc les éléments absents par de l'eau distillée. Cette étude n'est pas quantitative, la valeur précise des quantités n'a donc pas beaucoup d'importance.

	3-5 ml		1 ml		1 ml	Conditions	
	Empois d'amidon	Saccharose	Amylase fraîche	Amylase bouillie	Soude	Température	pH
Tube 1			X			40°C	neutre
Tube 2	X					40°C	neutre
Tube 3	X		X			40°C	neutre
Tube 4	X			X		40°C	neutre
Tube 5	X		X		X	40°C	basique
Tube 6	X		X			0°C	neutre
Tube 7		X	X			40°C	neutre

Réalisez les 7 tubes et **laissez**-les reposer pendant 30 minutes
Puis,

- placez quelques gouttes de chaque tube sur la plaque de titration, et **réalisez** le test à l'eau iodée.
- Prélevez une partie de chaque tube et **pratiquez** le test à la liqueur de Fehling.

Notez les résultats dans un tableau et interprétez-les en comparant chaque tube à un témoin.
Ecrivez la réaction de dégradation de l'amidon en présence d'amylase.
Dégagez les conditions d'action de la salive.

MODELISATION MOLECULAIRE ET NOTION DE COMPLEXE ENZYME-SUBSTRAT.

Ce que l'on sait:	**Ce que l'on cherche:**
Au cours d'une réaction enzymatique, le substrat se transforme progressivement (en 3 à 5 minutes) en présence de l'enzyme qui reste inchangée. *La structure de certaines enzymes est connue. Par la technique de la cristallographie aux rayons X, les scientifiques ont élaboré des modèles moléculaires de l'enzyme seule ou de l'enzyme avec son substrat.*	On cherche à comprendre au niveau moléculaire les interactions enzyme-substrat. Pour des raisons techniques, on n'étudiera pas l'amylase. On propose l'étude d'une autre enzyme: la pepsine qui est une protéase (elle hydrolyse les protéines).

Nous allons utiliser le logiciel de représentation en 3D RasTop.

Mode d'emploi succinct : Après le lancement, il est possible d'ouvrir le fichier d'une molécule.

On peut la déplacer en utiliser la souris lorsque l'on maintient le bouton de gauche enfoncé.

Le menu donne accès à la sélection ou la coloration d'une partie de la molécule.

Les boutons en dessous permettent notamment d'afficher la molécule sous différentes formes (fils, rubans, sphères…) ou de sélectionner un atome ou une chaîne (pour cela, cliquez sur le bouton puis cliquez sur l'atome que l'on veut sélectionner, et enfin de pas oublier de 'décliquer' le bouton de sélection).

Enfin, le cadre inférieur affiche des informations au fur et à mesure des actions.

Fichiers à votre disposition :

FICHIERS (DANS MOLECULES/ENZYME)	PROTEINES CORRESPONDANTES
1psn.pdb	Pepsine 3A
1pso. pdb	Pepsine 3A et son substrat (un peptide)

Problème 1 - Quelle est la structure de l'enzyme?

Capacités évaluées	Activité	Exigences
Mener une étude structurale de l'enzyme	Charger la pepsine seule, afficher et colorer ses éléments en sphères VdW puis en ruban.	*allure globale compréhensible*
	Molécule Séquence Lire la séquence	nombre de chaînes et d'acides aminés (affichage avec code 1 lettre)
	Afficher les Ponts disulfure et les Liaisons hydrogène (les colorer si non visibles) *Liaisons* **Ponts disulfure - Afficher** **Ponts disulfure – Type bâtonnets – Rayon 200** **Liaisons hydrogène - Afficher** **Liaisons hydrogène –Type bâtonnets – R= 20**	*Coloration des types de liaisons impliquées dans le maintien de la conformation spatiale* Nombre de ponts Nombre de liaisons hydrogène (liaisons faibles)

Fermer 1psn.pdb

Problème 2 - Où se trouve localisé le site catalytique?

Afin de découvrir le site catalytique, on propose de travailler sur l'image qui associe l'enzyme avec son substrat.

<table>
<tr><th>Capacités évaluées</th><th>Activité</th><th>Exigences</th></tr>
<tr><td>Observer une image simplifié du complexe enzyme/substrat.</td><td>Appréciation de la position du substrat "dans" l'enzyme.

Charger l'enzyme et son substrat (appelé i)
Afficher l'ensemble en Sphères
Colorer de façon à différencier les chaînes.
(Atomes-Colorer par chaînes)

Puis sélectionner l'enzyme et l'afficher en ruban.
(Cliquer Sélectionner la chaîne. Cliquer sur un carbone de la chaîne- puis décliquer 'sélectionner la chaîne' puis l'afficher en ruban)</td><td>L'enzyme avec son substrat de couleur différente, affichés de façon à les localiser facilement.</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Saisir des données sur le site catalytique à partir d'un logiciel</td><td colspan="2">Identifier le site catalytique
Effectuer une restriction à 1nm autour d'un seul acide aminé du substrat.
(Sélectionner un atome au centre du substrat /
Edition -Sélection-Distance / Edition – Restreindre)</td></tr>
<tr><td>Mettre en évidence les acides aminés du site catalytique.

Afficher en Sphères
Colorer par type de résidu ('Shapely')

Vous pouvez utiliser le bouton du bas 'Front' et les flèches à sa droite pour pratiquer une coupe dans la partie sélectionnée (en approchant le plan de coupe de la coordonnée 0)</td><td>Noms des acides aminés de l'enzyme pouvant être impliqués dans l'interaction enzyme/substrat</td></tr>
</table>

Concluez sur les différents éléments composant une enzyme et qui permettent, directement ou indirectement, la réalisation de la réaction chimique.